

Zur Hydrolyse von Aminosäure-Arylamiden durch mikrosomale Schweineleberesterase und Serum

Von E. BERNHAMMER¹⁾ und K. KRISCH²⁾

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger)

(Eingegangen am 16. August 1965)

L-Leucyl- β -naphthylamid („LNA“) und L-Leucyl-p-nitroanilid („LPNA“) werden durch eine hochgereinigte Esterase aus Schweinelebermikrosomen gespalten. Die Wechselzahlen für die beiden Substrate sind gering, nämlich 5—15 Mole Substrat/Min. \times Mol Enzym. Die Michaelis-Konstanten betragen $3,0 \times 10^{-3}$ M (LNA) bzw. $1,4 \times 10^{-3}$ M (LPNA). Die Hydrolyse von LNA durch Schweineleberesterase wird durch Diäthyl-p-nitrophenylphosphat („E 600“) vollständig gehemmt. — Die Dipeptide Glycyl-L-tyrosin, Glycyl-L-phenylalaninamid und L-Leucyl-L-tyrosin werden durch mikrosomale Schweineleberesterase nicht gespalten.

Die Hydrolyse von LNA durch menschliches Serum ist resistent gegen den Esterase-Inhibitor „E 600“ in Konzentrationen, welche die mikrosomale Leberesterase vollständig inaktivieren. Dies gilt auch für die bei Lebererkrankungen erhöhten LNA-spaltenden Aktivitäten des Serums. Dieser Befund spricht dagegen, daß mikrosomale Leberesterase im Serum vorkommt und an der „Arylamidase“-Aktivität des Serums beteiligt ist. — Zwei typische Arylamid-Substrate der von uns isolierten Leberesterase, Acetanilid und Phenacetin, werden durch Serum nicht hydrolytisch gespalten. — Einige Befunde zur Spaltung von LNA durch Leberhomogenat und zur intrazellulären Verteilung der Aktivität werden mitgeteilt.

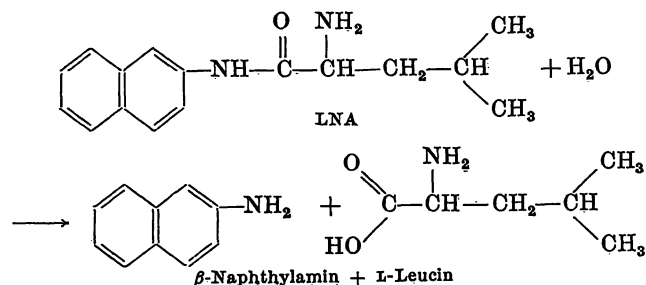
Unsere Ergebnisse zeigen, daß LNA ein wenig spezifisches Substrat ist und die für die LNA-Spaltung häufig gebrauchte Bezeichnung „Leucylaminopeptidase“-Aktivität aufgegeben werden sollte.

L-leucyl- β -naphthylamide („LNA“) and L-leucyl-p-nitroanilide („LPNA“) are hydrolysed by a highly purified esterase from pig liver microsomes. The turnover numbers for both substrates are low, namely 5—15 moles of substrate/min. per mole of enzyme. The Michaelis constants are 3.0×10^{-3} M (LNA) and 1.4×10^{-3} M (LPNA) respectively. The hydrolysis of LNA by pig liver esterase is completely inhibited by diethyl-p-nitrophenyl phosphate („E 600“). The dipeptides glycyl-L-tyrosine, glycyl-L-phenylalaninamide and L-leucyl-L-tyrosine are not hydrolysed by microsomal pig liver esterase.

The hydrolysis of LNA by human serum is not inhibited by the esterase inhibitor „E 600“ in concentrations which completely inhibit microsomal liver esterase. This is also true for the increased hydrolysis of LNA in serum during liver diseases. This finding contradicts the view that microsomal liver esterase is present in the serum and is responsible for the arylamidase activity of the serum. Two typical arylamide substrates, acetanilide and phenacetin, for the liver esterase isolated by us, are not hydrolysed by serum. Some findings on the cleavage of LNA by liver homogenates and the intracellular distribution of activity are reported.

Our results show that LNA is not a very specific substrate and the term „leucylaminopeptidase“-activity, frequently used for LNA cleavage, should be abandoned.

Im Jahre 1955 schlugen SELIGMAN und Mitarbeiter (1) L-Leucyl- β -naphthylamid („LNA“) als Substrat zur Bestimmung der Leucylaminopeptidase-Aktivität vor:



Diese Verbindung wird durch hochgereinigte Leucylaminopeptidase („LAP“) aus Schweineleber (2), nicht

aber durch Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin gespalten. Hieraus folgerten die Autoren, daß LNA ein spezifisches Substrat für das Enzym Leucylaminopeptidase darstellt. In den darauffolgenden Jahren wurde LNA dann häufig im klinisch-chemischen Laboratorium zur Bestimmung der sog. „Leucylaminopeptidase“-Aktivität im Serum (3—8), aber auch für histochemische Untersuchungen an Organschnitten (9, 10) benutzt. Die Bestimmung der LNA-spaltenden Aktivität des Serums ist von Bedeutung für die Differentialdiagnose von Lebererkrankungen (3—7).

In den letzten Jahren sind jedoch zunehmend mehr Befunde bekannt geworden, die zeigen, daß LNA ein nur wenig geeignetes, nicht-spezifisches Substrat zur Be-

Abkürzungen: LNA = L-Leucyl- β -naphthylamid
LPNA = L-Leucyl-p-nitroanilid
LAP = Leucylaminopeptidase
E 600 = Diäthyl-p-nitrophenylphosphat
EDTA = Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure.

¹⁾ Die vorliegende Arbeit enthält Ergebnisse aus der Dissertation von Frl. cand. med. E. BERNHAMMER.

²⁾ Auszugsweise vorgetragen auf der Tagung „Moderne analytische Methoden in der Lebensmittelchemie und biologischen Chemie“ der GDCh, Heidelberg 17.—19. 3. 1965.

stimmung der Leucylaminopeptidase ist (11–20). Die im Serum nachweisbare, LNA-spaltende Enzymaktivität ist heterogen und besitzt mit großer Wahrscheinlichkeit keine Beziehungen zu der „echten“ LAP, einem metallabhängigen Enzym, das erstmals von SPACKMAN und Mitarbeitern (2) aus Schweinenieren isoliert wurde. Die meisten Autoren stimmen heute darin überein, daß es *nicht* mehr berechtigt ist, bei nachgewiesener Spaltung von LNA in biologischem Material von „Leucylaminopeptidase“-Aktivität zu sprechen. Es werden daher in neuerer Zeit stattdessen die Bezeichnungen Arylaminopeptidase (21), Leucyl-naphthylamid-hydrolase (16), Aminosäure-Naphthylamidase (22) und Aminosäure-Arylamidase (18) vorgeschlagen.

Wir haben kürzlich über die Isolierung einer Esterase („Carboxylic ester hydrolase“, E. C. 3.1.1.1.) aus Schweinelebermikrosomen berichtet (23). Dieses Enzym verhält sich bei Säulenchromatographie, Papielektrophorese und bei der Sedimentation in der analytischen Ultrazentrifuge einheitlich (24); das Molekulargewicht beträgt 174000 (25). Wie die Untersuchung der Substratspezifität ergab, werden nicht nur Carboxylester (u. a. Tributyrin, Buttersäureäthylester, p-Nitrophenylacetat, Tyrosinäthylester, Procain), sondern auch eine Reihe von Arylamiden (Acetanilid, Phenacetin (26), Xylorin, Monoäthylglycinoxylid) hydrolysiert.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, daß LNA durch hochgereinigte Schweineleberesterase gespalten wird. Hieraus folgte, daß LNA kein spezifisches Substrat für LAP bzw. Aminosäure-arylamidasen darstellt, sondern daß sich die Substratspezifitäten dieser Enzyme und unserer Leberesterase teilweise überschneiden. Damit stellte sich auch die Frage, ob mikrosomale Leberesterase (oder ein ähnliches Enzym) im Serum vorkommt und an der Spaltung von LNA durch Serum beteiligt ist. Über einige experimentelle Befunde zur Klärung dieser Fragen soll im folgenden berichtet werden.

Methodik

L-Leucyl-β-naphthylamid

Die Spaltung von LNA durch Leberesterase bzw. Serum wird nach der von Wüsr (8) mitgeteilten Arbeitsvorschrift bestimmt. Statt des angegebenen Phosphatpuffers wird in 0,1 *m* Tris-HCl-Puffer, pH 8,6 (Optimum der mikrosomalen Leberesterase) gearbeitet. Die Methanol-Endkonzentration in den Ansätzen beträgt 10%. Ein Kontrollversuch zum Einfluß des zum Lösen von LNA verwendeten Methanols im Acetanilid-Standardtest (23) ergab bei 5% Endkonzentration eine 37-proz., bei 10% Methanol-Endkonzentration eine 54-proz. Hemmung des Enzyms. Die „wahren“ Umsätze des ungehemmten Enzyms für LNA wären danach etwa doppelt so hoch wie die nach der Methode von Wüsr ermittelten. Die Tatsache, daß LNA sehr schlecht wasserlöslich ist, macht es in diesem Test unmöglich, bei Substratsättigung zu arbeiten. Pro Ansatz werden jeweils 200–300 µg Enzymprotein (bestimmt mit der modifizierten Biuret-Methode (27)) eingesetzt.

L-Leucyl-p-nitroanilid

Die Absorptionsspektren von LPNA und p-Nitroanilid sind bei TUPPY und Mitarbeitern (28) angegeben. Der molare Extinktionskoeffizient des p-Nitroanilins in 0,1 *m* Trispuffer pH = 8,6 wurde von uns zu $11560 \text{ (l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$ bestimmt. Dieser Wert ist bei der Berechnung der Wechselzahlen zugrunde gelegt.

Ansatz: 0,8 ml/Substratlösung (10^{-2} m LPNA in 0,01 *n* HCl, zum Lösen gegebenenfalls noch 1 Tropfen 1 *n* HCl/10 ml zusetzen) werden mit Enzym (80–120 µg Protein) und 0,1 *m* Trispuffer pH 8,6 auf ein Gesamtvolumen von 2,0 ml gebracht. Die Reaktion wird mit Enzym gestartet und der Extinktionsanstieg in der 1 cm-Küvette 7 Min. lang in 1-Min.-Abständen bei 400 mµ im Spektralphotometer verfolgt, $T = 37^\circ$. Eine nichtenzymatische Spontanhydrolyse des Substrates ist unter den angegebenen Bedingungen nicht zu beobachten.

Glycyl-L-tyrosin, Glycyl-L-phenylalaninamid, L-Leucyl-L-tyrosin

Gly-L-tyr wurde von der Fa. Calbiochem (Los Angeles 63, Californien/USA), Gly-L-phe-NH₂ (als Acetat) von den Mann Res. Laboratories Inc., New York/USA und L-leu-L-tyr von Hoffmann-La Roche, Basel/Schweiz bezogen.

Ansatz: Je 10 µMol Dipeptid werden mit Enzym, entsprechend 3–4 mg Biuretprotein, in 10 ml 0,01 *m* Ammoniumacetatpuffer pH 8,6 für 60 Min. (in einigen Versuchen auch 90 Min.) bei 37° inkubiert. Die Ansätze werden durch Einfrieren bei -20° gestoppt und in kleinen Rundkolben gefriergetrocknet. (Das Ammoniumacetat des Puffers wird hierbei vollständig entfernt). Der Rückstand wird in etwa 1 ml 80-proz. Äthanol (angesäuert mit 3 Tropfen 5 *n* HCl/10 ml Äthanol) aufgenommen, 10 Min. bei etwa 3000 U./Min. klarzentrifugiert und vom Überstand 0,05–0,10 ml zur Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G aufgetragen.

Fließmittelsysteme: A) Ammoniak/Propanol (33:67) (v/v)

B) Butanol/Eisessig/Wasser (60:20:20) (v/v)

Farbentwicklung in bekannter Weise durch Ansprüchen mit Ninhydrin.

Einfluß von E 600 auf die LNA-Spaltung durch Human-serum

E 600-Stammlösung: 0,281 ml E 600 (99%, Bayerwerk Leverkusen) + 2 ml Äthylenglykolmonomethyläther werden mit 0,1 *m* Trispuffer pH 8,6 auf 25 ml aufgefüllt und gut durchgeschüttelt. Ungelöstes E 600 setzt sich in Form feiner Tröpfchen am Boden ab. Die überstehende Lösung ist gesättigt. Ihr Gehalt an E 600 wird durch alkalische Hydrolyse analytisch bestimmt. Hierzu werden 1 ml Überstand + 1 ml 1 *n* NaOH 60 Min. bei 70° hydrolysiert, abgekühlt, 1:100 mit 0,1 *m* Trispuffer pH 8,0 verdünnt und die Extinktion in 0,5 cm Küvetten bei 405 mµ gemessen. Unter Zugrundelegung eines Extinktionskoeffizienten von $16240 \text{ (l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$ für p-Nitrophenol errechnet sich die E 600-Konzentration der Stammlösung zu $1,2 \times 10^{-2} \text{ m}$.

Vor Gebrauch wird die Lösung 1:1000 mit 0,1 *m* Trispuffer pH 8,6 verdünnt und 0,4 ml der Verdünnung zum Test (Endvol. 2 ml) eingesetzt.

Die LNA-Spaltung durch Serum wird nach dem Verfahren von Wüsr (8) gemessen. Als Puffer wird auch hier 0,1 *m* Tris-HCl pH 8,6 verwendet. Die Normalseren stammten von gesunden Versuchspersonen unseres Laboratoriums.

Für die freundliche Überlassung von Patientenseren sind wir dem komm. Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Gießen, Herrn Prof. Dr. VOEGT und seinen Mitarbeitern zu Dank verpflichtet.

Inkubation von Serum mit Acetanilid und Phenacetin

Acetanilid wurde im „Standard-Test“ (23) unter Einsatz von 0,05 bis 0,25 ml Serum bis zu 60 Min. bei 37° inkubiert. Der Ansatz zur Bestimmung der enzymatischen Deacetylierung von Phenacetin wurde bereits an anderer Stelle mitgeteilt (26); es wurden 0,1 bis 0,4 ml Serum zum Test eingesetzt. Kontrollversuche unter Zusatz von Serum zum Acetanilid-Test mit isoliertem Schweineleberenzym ergaben keine Veränderung der Enzymaktivität.

LNA-Spaltung durch Leberhomogenat: Intrazelluläre Verteilung der Aktivität

Es werden weibliche Wistar-Ratten (Gewicht 100–200 g) verwendet, die mit einer Standarddiät („Atromin-R“) gefüttert wurden

Zur Herstellung von Leberhomogenat wird jeweils eine Rattenleber mit dem 10-fachen Volumen (ml/g) entweder 0,25 *m* Saccharose + 0,001 *m* EDTA + 0,02 *m* Tris-HCl pH 7,4 oder 0,1 *m* Tris-HCl pH 8,6 im Glashomogenisator homogenisiert. Zum LNA-Test (8) werden 0,05 ml Rattenleberhomogenat eingesetzt. Das Vorgehen bei der Differentialzentrifugation von Schweineleberhomogenat wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (23). Kerne, Mitochondrien und Mikrosomen werden jeweils einmal nachgewaschen; die zum LNA-Test eingesetzten Mengen der einzelnen Fraktionen entsprechen ebenfalls den früheren Angaben.

Ergebnisse

L-Leucyl- β -naphthylamid

Wir haben zunächst untersucht, ob bei der Isolierung unserer Esterase aus Schweinelebermikrosomen auch die LNA-hydrolysierende Aktivität mit angereichert wird. Hierzu wurde die Ammoniumsulfatfraktion 50–80% [Schritt IV des Isolierungsganges (23)] durch Säulenchromatographie an DEAE-Sephadex weiter gereinigt. Die durch Kochsalz-, „Gradientenelution“ erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre Enzymaktivitäten gegen die drei Substrate Acetanilid, *o*-Nitrophenylacetat und LNA geprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 1 dargestellt. Man erkennt aus den UV-Extinktionen bei 280 m μ , daß die Präparation in diesem Stadium noch mindestens drei Proteinkomponenten enthält. Nur der mittlere Gipfel, der bei einer Kochsalzkonzentration von 0,1–0,2 *m* eluiert wird, enthält Enzymaktivität. Hierbei laufen die Acetanilid-, *o*-Nitrophenylacetat- und LNA-spaltenden Enzymaktivitäten parallel. Das Verhältnis der drei Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen ist etwa konstant; die Maxima liegen übereinstimmend bei Fraktion 60–61. Alle Aktivitäten sind in μ Mol/Min. \times ml angegeben. Ein Vergleich der Maßstäbe zeigt, daß sich die Umsätze für LNA, Acetanilid und *o*-Nitrophenylacetat annähernd wie 0,1:1:100 verhalten. Dies stimmt befriedigend mit früheren Angaben von uns überein (24).

Die weitere Reinigung des Enzymgipfels erfolgt dann durch Fällung mit Ammoniumsulfat (Schritt VI) und nochmalige Rechromatographie an DEAE-Sephadex. Auch die so erhaltene, hochgereinigte Esterasepräparation aus Schweineleber besitzt LNA-spaltende Aktivität. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und eingesetzter Enzymmenge. Die Umsätze sind, ebenso wie bei anderen früher geprüften Arylamiden (24), nur gering. Unter Zugrundelegung des durch Ultrazentrifugation ermittelten Molekulargewichtes von 174000 errechnet sich für LNA eine Wechselzahl von etwa 5–10 Mol/Min. \times Mol Esterase (25).

Zur Ermittlung der *Michaelis*-Konstanten haben wir die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der LNA-Konzentration untersucht und die erhaltenen Werte doppelt reziprok nach LINEWEAVER-BURK (29) aufgetragen (Abb. 2). Die *Michaelis*-Konstante der mikrosomalen Esterase aus Schweineleber ergibt sich hieraus zu

$$K_M (\text{L-Leucyl-}\beta\text{-naphthylamid}) = 3,0 \times 10^{-3} \text{ m}$$

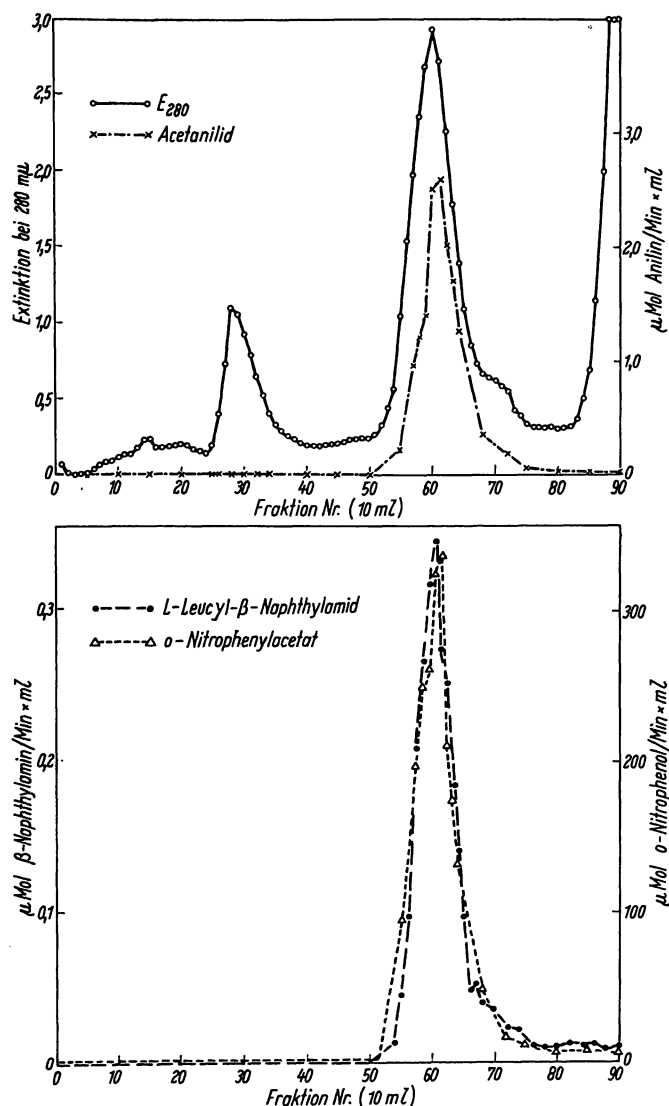


Abb. 1

Säulenchromatographie von Schweineleberesterase (nach Schritt VI) an DEAE-Sephadex A 50
Vergleich der Aktivitäten gegen die Substrate Acetanilid, *o*-Nitrophenylacetat und LNA (vgl. (23))

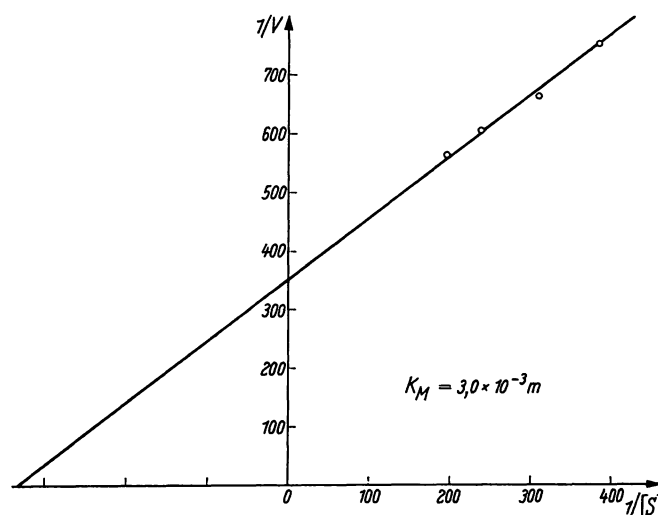


Abb. 2

Graphische Ermittlung der *Michaelis*-Konstante mikrosomaler Schweineleberesterase für *L*-Leucyl- β -naphthylamid. Auftragung nach LINEWEAVER-BURK

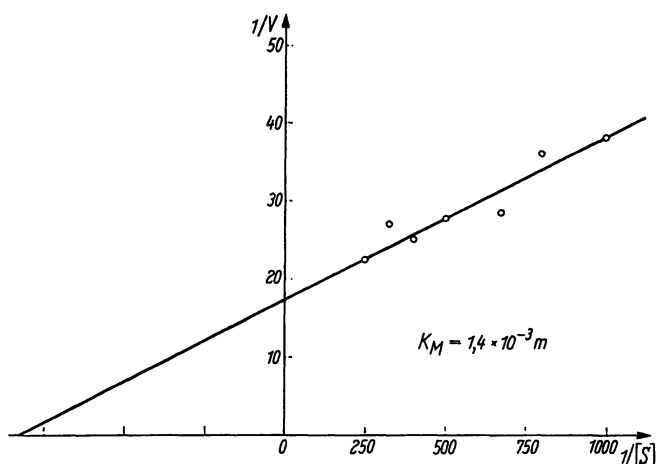


Abb. 3

Graphische Ermittlung der *Michaelis*-Konstante mikrosomaler Schweineleberesterase für L-Leucyl-p-nitroanilid. Auftragung nach LINEWEAVER-BURK

(Mittelwert von drei Experimenten mit verschiedenen Enzympräparationen).

Die mikrosomale Leberesterase wird hochempfindlich durch organische Phosphorsäureester gehemmt (24). $2,4 \times 10^{-6}$ m E 600 (Diäthyl-p-nitrophenylphosphat) bewirken eine vollständige Hemmung des Enzyms. Wie zu erwarten, wird auch die Spaltung von LNA durch das isolierte Enzym in Gegenwart von E 600 fast vollständig gehemmt (Tab. 1). Dagegen ist bei unreinen Esterasepräparationen der Anteil der E 600-resistenten Restaktivität gegen LNA meist höher.

Tab. 1

Spaltung von L-Leucyl- β -naphthylamid durch mikrosomale Esterase aus Schweineleber: Hemmung durch E 600

	Aktivität		% Hemmung
	ohne E 600	mit E 600	
1	25,00	0,36	98,6
2	31,7	1,15	96,4
3	41,6	0,00	100,0

Aktivitäten angegeben in $\mu\text{Mol } \beta\text{-Naphthylamid} \times \text{Min.}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1}$. E 600-Endkonzentration: $2,4 \times 10^{-6}$ m.

Es wurden drei verschiedene Enzympräparationen untersucht.

L-Leucyl-p-nitroanilid

1962 berichteten TUPPY, WIESBAUER und WINTERBERGER (28) über eine Reihe von Aminosäure-p-nitroaniliden als Substraten für Amino-peptidasen. Auf Grund des gelb gefärbten p-Nitroanilidrestes kann die enzymatische Hydrolyse dieser Substrate direkt photometrisch in der Küvette verfolgt werden. L-Leucyl-p-nitroanilid (LPNA) ist — ebenso wie LNA — zur Bestimmung der Aminosäure-Arylamidase-Aktivität des Serums verwendet worden (18). LPNA wird ebenfalls durch die von uns isolierte hochgereinigte Schweineleberesterase gespalten. Auch für LPNA ergeben sich nur geringe Wechselzahlen, die im gleichen Bereich wie die Umsätze von LNA liegen. Wir finden Werte von

5–10 Molen p-Nitroanilin/Min. \times Mol Enzym. Die *Michaelis*-Konstante der Leberesterase beträgt

$$K_M (\text{L-Leucyl-p-nitroanilid}) = 1,4 \times 10^{-3} \text{ m}$$

Das entsprechende LINEWEAVER-BURK-Diagramm ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Glycyl-L-tyrosin, Glycyl-L-phenylalaninamid, L-Leucyl-L-tyrosin

Angesichts der beobachteten Arylamidase-Aktivität und zur Abgrenzung der Schweineleberesterase von intrazellulären Peptidasen ist die Frage von besonderem Interesse, ob das Enzym auch Peptidbindungen hydrolysiert. Wie bereits früher mitgeteilt wurde, werden weder Casein noch Hämoglobin, noch die Dipeptide Glycyl-L-prolin, Glycyl-L-Valin, L-Seryl-glycin und L-Leucyl-glycin (ein typisches Leucylaminopeptidase-Substrat) gespalten. In Ergänzung dieser Befunde haben wir in der letzten Zeit noch Glycyl-L-tyrosin, Glycyl-L-phenylalaninamid-acetat und L-Leucyl-tyrosin als mögliche Substrate geprüft. Hierbei handelt es sich um Dipeptide mit jeweils einem aromatischen Aminosäurerest. Dies schien uns deswegen von Interesse, da die mikrosomale Leberesterase bestimmte Arylamide und auch Tyrosinäthylester spaltet. Zum Nachweis einer Hydrolyse haben wir versucht, nach Inkubation der genannten Dipeptide mit isoliertem Enzym dünn-schichtchromatographisch freie Aminosäuren nachzuweisen. Wie Abbildung 4 zeigt, ist das Ergebnis negativ; die drei Dipeptide werden durch Schweineleberesterase nicht angegriffen. Das isolierte Enzym besitzt demnach keine Dipeptidase-Wirkung und unterscheidet sich hierin von der LAP aus Schweinenieren (2), welche eine große Anzahl von Dipeptiden, u. a. auch L-Leucyl-glycin, L-Leucyl-L-tyrosin und Glycyl-L-tyrosin spaltet.

Einfluß von E 600 auf die Spaltung von L-Leucyl- β -naphthylamid durch Humanserum

Da LNA durch hochgereinigte mikrosomale Schweineleberesterase hydrolysiert wird, war zu prüfen, ob dieses (bzw. ein ähnliches) Enzym an der LNA-Spaltung durch Serum beteiligt ist. Diese Frage läßt sich auf Grund der hohen Empfindlichkeit der Leberesterase gegen E 600

AD	B ₁	C ₁	A ₂	B ₂	C ₂
+ Enzym			Kontrolle (ohne Enzym)		
Leu-Tyr			Leu-Tyr		
Gly-Tyr	Gly-Phe-NH ₂		Gly-Tyr	Gly-Phe-NH ₂	
x	x	x	x	x	x

Abb. 4

Ausschluß einer Dipeptidasewirkung von Schweineleberesterase
Dünn-schichtchromatographische Untersuchung von Glycyl-L-Tyrosin, Glycyl-L-Phenylalaninamid und Leucyl-L-Tyrosin

klären. „Echte“ LAP aus Schweinenieren wird dagegen durch Alkylphosphate, wie Diisopropylfluorophosphat, nicht gehemmt (30). Wir haben daher die Hydrolyse von LNA durch Humanserum jeweils mit und ohne E 600 gemessen. In den Ansätzen mit E 600 beträgt die Endkonzentration des Hemmstoffes $2,4 \times 10^{-6} m$. Diese Konzentration inaktiviert das isolierte Enzym fast vollständig (Tab. 1). Wenn die „Aminosäure-Arylamidase“-Aktivität des Serums auf eine mit unserem Enzym verwandte oder identische Esterase zurückzuführen wäre, müßte sie (vollständig, oder bei Beteiligung anderer Enzyme zumindest teilweise) durch E 600 zu hemmen sein. Unsere Ergebnisse zu dieser Frage sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Man erkennt, daß die enzymatische Spaltung von LNA durch Serum gesunder Versuchspersonen vollständig resistent gegen E 600 ist. Versuche mit 10-fach höherer E 600-Konzentration ($2,4 \times 10^{-5} m$) ergaben ebenfalls keine Hemmung.

Es ist bekannt, daß die früher meist als „Leucylamino-peptidase“ bezeichnete Aktivität des Serums gegen LNA als Substrat bei entzündlichen Leberparenchymschäden, beim Verschlußikterus und insbesondere auch bei cholangitischen Prozessen erhöht ist (3—7, 18). Wir haben daher auch eine Reihe ikterischer Patientenserum untersucht, da interessierte, ob möglicherweise unter *pathologischen* Bedingungen ein Übertritt von mikrosomaler Leberesterase ins Serum stattfindet. Dies müßte dann in einer — mindestens partiellen — Hemmbarkeit der erhöhten LNA-spaltenden Aktivität durch E 600 zum Ausdruck kommen. Der Einfluß von E 600 auf die LNA-Spaltung durch Serum von 10 Patienten mit hepatischem Ikterus verschiedener Genese ist aus Tabelle 2 ersichtlich. Wie nach der Literatur zu erwarten, findet sich dabei eine Aktivitätserhöhung, die im Vergleich zu den Normalserum im Mittel etwa das Doppelte beträgt. Jedoch bestehen auch in diesen Fällen keine signifikanten Differenzen zwischen den mit und ohne E 600 inkubierten Ansätzen.

Inkubation von Serum mit Acetanilid und Phenacetin

Angesichts der Tatsache, daß die beiden Aminosäure-arylamide LNA und LPNA durch Serum hydrolysiert werden, war zu klären, ob andere Amidsubstrate der mikrosomalen Leberesterase ebenfalls durch Serum gespalten werden und ob sich daraus Hinweise auf das Vorkommen von mikrosomaler Leberesterase (oder einem verwandten Enzym) im Serum ergeben. Zwei typische Amidsubstrate der von uns isolierten Schweineleberesterase sind Acetanilid und Phenacetin. Beide Verbindungen wurden mit Humanserum inkubiert. Das Ergebnis war in allen Fällen negativ. Sowohl Acetanilid, als auch Phenacetin werden durch Humanserum nicht meßbar deacetyliert. Das gleiche Resultat erhält man mit Schweineserum; auch im Schweineserum sind keine Acetanilid- oder Phenacetin-spaltenden Enzymaktivitäten nachweisbar.

Einfluß von E 600 auf die LNA-Spaltung durch Leberhomogenat. Intrazelluläre Verteilung der LNA-spaltenden Aktivität in der Schweineleber

In Ergänzung der mitgeteilten Befunde zur „Aminosäurearylamidase“-Aktivität des Serums haben wir einige Versuche zur Charakterisierung der LNA-spaltenden Aktivität der Leber durchgeführt. Es kann angenommen werden, daß zumindest die bei Leberschäden vermehrte LNA-spaltende, E 600-resistente Enzymaktivität im Serum aus dem Leberparenchym stammt. In diesem Zusammenhang ist interessant, ob und in welchem Umfang mikrosomale Leberesterase an der LNA-Spaltung durch Leberhomogenat beteiligt ist. Auch in diesem Fall kann der Hemmversuch mit E 600 Hinweise geben. — Die Tabelle 3 zeigt Ergebnisse zur Hydrolyse von LNA durch Rattenleberhomogenat mit und ohne E 600. Wegen einer möglichen Hemmwirkung von EDTA auf metallabhängige Arylamidasen wurden die Lebern nicht nur in EDTA-haltigem Saccharose-Medium, sondern auch in 0,1 *m* Trispuffer pH 8,6

Tab. 2. Einfluß von E 600 auf die Spaltung von L-Leucyl- β -Naphthylamid durch Humanserum

	Normalserum		Klin. Diagnose	Pathologische Seren	
	ohne E 600	mit E 600		ohne E 600	mit E 600
W. S.	8,5	8,1	Lebercirrhose	17,5	17,3
K. D.	15,3	14,2	Verschlußikterus	19,8	19,8
P. F.	12,6	12,1	Chron. Hepatitis	13,3	13,9
E. D.	11,3	10,0	Ikterus	52,9	53,3
R. H.	14,0	12,4	Ikterus	32,7	34,4
F. K.	15,7	15,5	Lebercirrhose	28,2	27,6
W. F.	10,1	9,7	Hepatitis	10,7	10,1
M. K.	8,9	8,1	Hepatitis	14,9	15,1
K. K.	15,0	15,0	Hepatitis epidemica	33,3	33,3
H. B.	13,0	13,2	Hepatitis epidemica	36,3	36,0
Mittel \bar{x}	12,4	11,8		26,0	26,1
Standardabweichung S	2,6	2,7		13,2	12,8

Aktivitäten angegeben in $\mu\text{Mol } \beta\text{-Naphthylamid} \times \text{Min.}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ Serum; E 600-Endkonzentration: $2,4 \times 10^{-6} m$.

Die statistische Auswertung (t-Verfahren) ergibt, daß die Wahrscheinlichkeit $P \geq 0,05$ ist; die Mittelwerte der beiden Meßreihen (mit und ohne E 600) sind *nicht* signifikant verschieden. Der Unterschied zwischen normalen und pathologischen Seren ist signifikant ($P < 0,05$).

homogenisiert. Die Aktivität von „Tris-Homogenat“ ist etwa 15% höher, als die Aktivität von „Saccharose-EDTA-Homogenat“. Aus Tabelle 3 geht hervor, daß die LNA-Spaltung durch Leberhomogenat vollständig resistent gegen E 600 ist.

Tab. 3

Spaltung von L-Leucyl- β -naphthylamid durch Rattenleberhomogenat: Einfluß von E 600

Saccharose-Medium*)		0,1 M Trispuffer pH = 8,6	
ohne E 600	mit E 600	ohne E 600	mit E 600
4,80 \pm 0,87	4,77 \pm 1,28	5,55 \pm 0,75	5,64 \pm 1,23

Aktivitäten in nMol β -Naphthylamin \times Min.⁻¹ \times mg Protein⁻¹; Mittelwerte und Standardabweichung von 5 Versuchen; E 600-Konzentration $2,4 \times 10^{-6}$ M.

*) 0,25 M Saccharose + 0,001 M EDTA + 0,02 M Trispuffer; pH 7,4.

Zum Studium der intrazellulären Verteilung haben wir durch Differentialzentrifugation Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen und Cytoplasma gewonnen und die Aktivitäten dieser Fraktionen (mit und ohne E 600) im LNA-Test bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 wiedergegeben. Es ist offensichtlich, daß die Aktivität nicht in einer bestimmten Zellfraktion lokalisiert werden kann, sondern über alle Fraktionen „verschmiert“ ist. Die spezifische Aktivität der Mikrosomenfraktion ist allerdings etwas höher, als die der übrigen Fraktionen. E 600 hat auch in diesem Versuch keine Hemmwirkung auf die LNA-Spaltung durch Kerne, Mitochondrien und Cytoplasma. Lediglich für die Mikrosomenfraktion ergibt sich im Ansatz mit E 600 eine gering verminderte Aktivität.

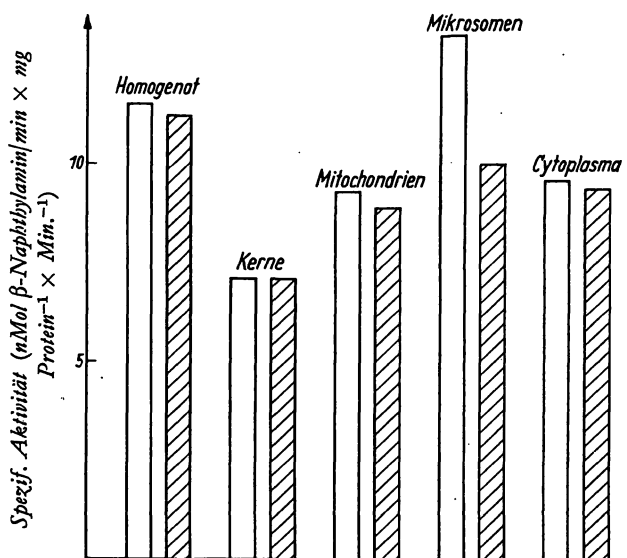


Abb. 5

Intrazelluläre Verteilung der LNA-spaltenden Aktivitäten in der Schweineleber: Einfluß von E 600

Mittelwerte aus zwei Versuchen; E 600-Endkonzentration $2,4 \times 10^{-6}$ M

Leere Säulen: ohne E 600. Schraffierte Säulen: mit E 600.

Aus den mitgeteilten Befunden ergibt sich, daß die von uns isolierte mikrosomale Esterase nicht nennenswert an der LNA-Spaltung durch Leberhomogenat beteiligt ist. Es muß daher noch die Existenz weiterer, wahrscheinlich vorwiegend im Cytoplasma lokalisierter und durch Alkylphosphate nicht hemmbarer Arylamidasen in der Leber angenommen werden.

Diskussion

Unsere Befunde zeigen erneut, daß LNA und LPNA keine spezifischen Substrate für das Enzym Leucylaminopeptidase sind. Beide Verbindungen werden auch durch eine hochgereinigte Esterase aus Schweinelebermikrosomen gespalten. Auf Grund der hohen Empfindlichkeit der Tests sind die Aktivitäten gut meßbar. bei der Umrechnung auf Wechselzahlen zeigt sich jedoch, daß die Umsätze sehr gering sind, nämlich für beide Substrate nur zwischen 5–15 Mol Substrat pro Mol Enzym und Minute betragen. Die Hydrolyse von LNA durch isolierte Schweineleberesterase wird durch E 600 vollständig gehemmt. Dies spricht dafür, daß der Umsatz am aktiven Zentrum des Esterasemoleküls erfolgt und nicht auf eine Verunreinigung unserer Präparation durch andere Peptidasen zurückzuführen ist. Letzteres ist auch deswegen wenig wahrscheinlich, weil unsere Enzympräparation nach drei verschiedenen Kriterien (Papierelektrophorese, Ultrazentrifugation, Säulenchromatographie) im Rahmen der Nachweisgrenzen dieser Methoden keine Fremdproteine mehr erkennen ließ. Eine Trennung von Esterase- und Säureamidaseaktivität war bisher nicht möglich. Die beiden Aktivitäten werden bei der Isolierung zusammen angereichert, eluieren bei Säulenchromatographie im gleichen Gipfel (Abb. 1) und zeigen ein gleiches Verhalten gegenüber Inhibitoren (24). — Ob das von uns für Schweineleberesterase gefundene Substratspezifitäts-Muster auch für Esterasen anderer Organe und Tierarten gilt, wird zur Zeit von uns geprüft. Versuche zur Isolierung mikrosomaler Esterase aus menschlicher Leber scheiterten zunächst an der Schwierigkeit, genügend frisches Ausgangsmaterial zu erhalten.

Aus den mitgeteilten Ergebnissen folgt, daß sich die Substratspezifitäten der mikrosomalen Esterase aus Schweineleber und der Leucylaminopeptidase überschneiden. Eine Abgrenzung der beiden Enzyme ist jedoch auf Grund anderer Eigenschaften klar möglich: „Echte“ LAP wird durch Metalle (Mn^{++} , Mg^{++}) sowie durch Cystein und Ascorbinsäure aktiviert und durch EDTA gehemmt. LAP wird durch Diisopropylfluorophosphat nicht gehemmt (30). Das Molekulargewicht der LAP beträgt etwa 300 000 (30) bzw. 326 000 (31). Das pH-Optimum liegt bei 5. Die meisten Dipeptide werden rasch gespalten. Alle diese Eigenschaften unterscheiden LAP grundlegend von mikrosomaler Schweineleberesterase. Es sei erwähnt, daß kürzlich kritische Einwände gegen die LAP-Präparation von SPACKMAN und Mitarbeitern (2) erhoben worden sind (32).

Die Substratspezifität des von uns isolierten Enzyms ist vergleichsweise gering. Bei einem Vergleich der Wechselzahlen [(24), s. auch Abb. 1] wird deutlich, daß die Spaltung von Arylamiden nur eine „Nebenfunktion“ der isolierten Esterase darstellt. Für Carboxylester findet man um 2–3 Zehnerpotenzen höhere Wechselzahlen, als für Amidsubstrate.

Wie der Hemmversuch mit E 600 zeigt, ist mikrosomale Leberesterase an der Gesamtsplattung von LNA durch Leberhomogenat nicht beteiligt. Die wahrscheinlichste Deutung für dieses zunächst überraschende Ergebnis ist, daß mikrosomale Leberesterase aus kinetischen Gründen nicht am LNA-Umsatz durch Leberhomogenat teil hat. Hierfür sprechen die sehr niedrigen Wechselzahlen des isolierten Enzyms für LNA, sowie die aus den K_M -Werten ersichtliche, verhältnismäßig geringe Affinität der Leberesterase gegen das Substrat LNA. Es muß angenommen werden, daß in der Leber noch weitere Arylamidasen in hoher Aktivität vorkommen, welche nicht durch E 600 gehemmt werden. Vermutlich ist die Erhöhung der LNA-splattenden Aktivität im Serum bei Leberschäden auf diese Enzyme zurückzuführen.

Die nähere Charakterisierung dieser Arylamidasen der Leber steht noch in den Anfängen: PATTERSON, HSIAO, KEPPEL und SOROF (19) konnten im Cytoplasma der Rattenleber zonenelektrophoretisch und säulenchromatographisch drei LNA-splattende Arylamidasen von Leucylaminopeptidase (Substrat Leucinamid) und anderen Peptidasen trennen. In jüngster Zeit berichteten

SMITH, KAUFMAN und RUTENBURG (22) über die teilweise Reinigung einer Aminosäure-Naphthylamidase aus menschlicher Leber. Dieses Enzym unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von unserer Esterase, u. a. darin, daß es metallabhängig (Co^{++} , Zn^{++}) ist und eine wesentlich höhere Affinität zu LNA besitzt ($K_M = 7 \times 10^{-5} \text{ m}$). Beim Studium der intrazellulären Verteilung der LNA-splattenden Aktivität in der Leber finden diese Autoren, ebenso wie wir, ein ganz uncharakteristisches Verhalten. Das Gebiet der intrazellulären Peptidasen, Arylamidasen und Esterasen ist zur Zeit immer noch sehr komplex und unübersichtlich. Ihre physiologische Bedeutung ist ungeklärt. Künftige Fortschritte auf diesem Gebiet dürften über die Reindarstellung weiterer Enzyme führen.

Jedenfalls geht auch aus unseren Befunden hervor, daß es *nicht* berechtigt ist, von „Leucylaminopeptidase“-Aktivität zu sprechen, wenn in biologischem Material eine Spaltung von LNA gefunden wird, sondern daß diese Aktivität in jedem Fall weiterer enzymchemischer Charakterisierung bedarf.

Die Verfasser danken Herrn Professor STAUDINGER für die Förderung ihrer Arbeit und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet. Frl. W. SEIFERT sei auch an dieser Stelle für zuverlässige und geschickte Mitarbeit gedankt.

Für die freundliche Überlassung einer Probe LPNA danken wir Herrn Dr. W. NAGEL, Physiol.-Chem. Institut der Universität Heidelberg.

Literatur

1. GREEN, M. N., K. C. TSOU, R. BRESSLER und A. M. SELIGMAN, Arch. Biochem. Biophysics 57, 458 (1955). — 2. SPACKMAN, D. H., E. L. SMITH und D. M. BROWN, J. biol. Chemistry 212, 255 (1955). — 3. ARST, H. E., R. T. MANNING und M. DELP, Amer. J. Med. Sc. 238, 598 (1959). — 4. RUTENBURG, A. M., J. A. GOLDBARG und E. P. PINEDA, N. England J. Med. 259, 469 (1958). — 5. BRESSLER, R., B. R. FORSYTH und A. G. KLATSKIN, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 56, 417 (1960). — 6. GÖGGE, K. H., W. CREUTZFELD und J. MURUCAS, Dtsch. med. Wschr. 85, 1756, 1808 (1960). — 7. RÄSSLER, B. und H. SCHÖN, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 6, 583 (1961). — 8. WÜST, H., in: Methoden der enzymat. Analyse, S. 830, Hrsg. von H.-U. Bergmeyer, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr. (1962). — 9. NACHLAS, M. M., D. T. CRAWFORD und A. M. SELIGMAN, J. Histochem. Cytochem. 5, 264 (1957). — 10. PEARSE, A. G. E., Histochemistry, theoretical and applied, 2. Aufl., S. 587, J. and A. Churchill, London (1960). — 11. SCHOBEL, B. und F. WEWALKA, Klin. Wschr. 40, 1048 (1962). — 12. PATTERSON, E. K., S. H. HSIAO und A. KEPPEL, J. biol. Chemistry 238, 3611 (1963). — 13. HANSON, H., P. BOHLEY und H.-G. MANNFELDT, Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 8, 555 (1963). — 14. NAKAGAWA, S., Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 10, 572 (1964). — 15. DIENSTL, F., S. SAILER, F. SANDHOFER und H. BRAUNSTEINER, Klin. Wschr. 42, 794 (1964). — 16. O'CONNELL, W. und R. J. WINZLER, Cancer Res. 23, 78 (1963). — 17. FLEISHER, G. A., M. PANKOW und C. WARINKA, Clin. Chim. Acta. (Amsterdam) 9, 259 (1964). — 18. NAGEL, W., F. WILLIG und F. H. SCHMIDT, Klin. Wschr. 42, 447 (1964). — 19. PATTERSON, E. K., S.-H. HSIAO, A. KEPPEL und S. SOROF, J. biol. Chemistry 240, 710 (1965). — 20. BEHAL, F. J., R. D. HAMILTON, F. B. DAWSON und L. C. TERRELL, Arch. Biochem. Biophysics 108, 207 (1964). — 21. NACHLAS, M. M., T. P. GOLDSTEIN und A. M. SELIGMAN, Arch. Biochem. Biophysics. 97, 223 (1962). — 22. SMITH, E. E., J. T. KAUFMAN und A. M. RUTENBURG, J. biol. Chemistry 240, 1718 (1965). — 23. KRISCH, K., Biochem. Z. 337, 531 (1963). — 24. KRISCH, K., Biochem. Z. 337, 546 (1963). — 25. BOGUTH, W., K. KRISCH und H. NIEMANN, Biochem. Z. 341, 149 (1965). — 26. BERNHAMMER, E. und K. KRISCH, Biochem. Pharmacol. 14, 863 (1965). — 27. BEISENHERZ, G., H.-J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT und G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953). — 28. TUPPY, H., U. WIESBAUER und E. WINTERSBERGER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 329, 278 (1962). — 29. LINEWEAVER, H. und D. BURK, J. Amer. chem. Soc. 56, 658 (1934). — 30. SMITH, E. L. und R. L. HILL, in: The Enzymes, herausgeg. von P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck, Bd. 4, S. 52, Acad. Press. Inc., New York-London (1960). — 31. KRETSCHMER, K. und H. HANSON, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 340, 126 (1965). — 32. PFLEIDERER, G. und P. G. CELLIERS, Biochem. Z. 339, 186 (1963); Wachsmuth, E. D. und G. Pfeiderer, Herbsttagung der Gesellschaft für Physiol. Chemie, Köln, 21.–24. 10. 1964.

Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Krisch,
Physiol.-Chem. Institut der Justus-Liebig-Universität
63 Gießen, Friedrichstr. 24